

بررسی اثر کارواکرویل بر بیان ژن اینترلوکین-۶ و پروتئین های سیگنالی در رده سلول های سرطانی پروستات

مهناز کلوشادی^۱، اسفندیار حیدریان^{۲*}، کیهان قطره سامانی^۳، محمود رفیعیان کوپایی^۴

کمیتة تحقیقات دانشجویی، مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ ^۲مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی،

دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ ^۳مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران؛

^۴مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۱/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۳/۵/۲۵

چکیده:

زمینه و هدف: اینترلوکین-۶ باعث ایجاد خاصیت آنتی آپوپتوزی و مقاومت دارویی در سلول های سرطانی پروستات می شود. هدف از این مطالعه بررسی اثر کارواکرویل بر بیان ژن IL-6، پروتئین های سیگنالی آن و توانایی مهاجرت در رده سلول های سرطان پروستات (DU-145) می باشد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی، سلول های DU-145 با غلظت های مختلف کارواکرویل به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. سپس، درصد زیست پذیری سلول ها به کمک روش رنگ سنجی تترازولیوم (MTT) اندازه گیری و غلظت مهارکنندگی ۵۰ درصد رشد سلول ها (IC₅₀) محاسبه شد. میزان IL-6 در غلظت های مختلف کارواکرویل با استفاده از کیت الایزا تعیین شد. بیان ژن IL-6 و پروتئین های سیگنالی آن (pAkt، pErk، pStat3) به ترتیب با استفاده از روش های Real time RT PCR و Western blot تعیین شدند. توانایی مهاجرت و تهاجم سلول های DU-145 با استفاده از تست Invasion بررسی شد.

یافته ها: میزان IC₅₀ کارواکرویل معادل ۴۰۶/۲ μM به دست آمد. کارواکرویل در غلظت ۱۵۰ μM باعث افزایش بیان mRNA مربوط به IL-6 و افزایش سنتز پروتئین آن گردید؛ اما در غلظت های بالاتر از ۱۵۰ μM بیان mRNA و سنتز IL-6 به صورت وابسته به دوز کاهش یافت (P<۰/۰۵). کارواکرویل در غلظت بالاتر از ۱۵۰ μM بصورت وابسته به دوز باعث کاهش پروتئین های مسیرهای سیگنالی داخل سلولی pAkt، pErk، pStat3 و pAkt شد؛ همچنین، کارواکرویل توانایی تهاجم و زیست پذیری سلول های سرطانی DU-145 پروستات را به طور معنی داری کاهش داد (P<۰/۰۵).

نتیجه گیری: کارواکرویل از طریق کاهش پروتئین های مسیرهای سیگنالی داخل سلولی و بیان ژن IL-6 باعث کاهش رشد، تکثیر و توانایی مهاجرت سلولی و باعث القاء آپوپتوز در سلول های سرطان پروستات (DU-145) می گردد. بنابراین، کارواکرویل به عنوان یک ماده درمانی سودمند در درمان سرطان پروستات می تواند مورد توجه قرار گیرد.

واژه های کلیدی: اینترلوکین-۶، سرطان پروستات، کارواکرویل، پروتئین های سیگنالی.

مقدمه:

درمان با محروم سازی از آندروژن قرار دارند برای مدت زمان کمی بهبود می یابند؛ اما بعد از مدتی سلول های سرطانی پروستات نسبت به این روش درمان مقاوم می شوند و تومور دوباره رشد خود را آغاز می کند؛ در حالی که دیگر برای تکثیر نیازی به حضور هورمون آندروژن ندارد و در نتیجه روش محروم سازی

دومین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در میان مردان ایالت متحده آمریکا (USA) سرطان پروستات (Prostate cancer= PC) می باشد و افزایش قابل توجه ای از شیوع این بیماری در دو دهه گذشته در آسیا دیده می شود (۲،۱). سرطان پروستات اغلب به صورت بدخیم شناسایی می شود. بیماران PC که تحت

از آندروژن دیگر نمی تواند منجر به بهبود بیمار گردد. در این مرحله از بیماری رشد غیر قابل کنترل و متاستاز فعال سلول های بدخیم شدید می باشد (۱-۳).

اینترلوکین-۶ (IL-6 = Interleukin 6) پروتئینی با وزن مولکولی ۲۸-۲۱ kDa می باشد که حاوی ۱۴۸ آمینو اسید می باشد که بعداً به یک پپتید سیگنالی با ۲۸ آمینو اسید شکسته می شود. IL-6 در تنظیم و تمایز رشد بسیاری از سلول های سرطانی از جمله Melanoma,

Renal cell carcinoma, Kaposi sarcoma, Ovarian Prostate carcinoma, Lymphoma and leukemia carcinoma در ارتباط می باشد (۴). مدارک قطعی وجود دارند که نشان می دهند، IL-6 در پیشرفت سرطان پروستات نقش مهمی را بازی می کند. یافته های اخیر اثبات می کنند که IL-6 به عنوان یک فاکتور رشد اتوکراین و پاراکراین برای دو لاین سلولی سرطان پروستات انسانی PC3 و DU-145 عمل می کند و در شرایط Castrate باعث بقا سلول های حساس به آندروژن اتوکراین و پاراکراین می شود (۵-۷). افزایش بیان IL-6 باعث افزایش رشد سلول های آدنوکارسینوم حساس به آندروژن پروستات مانند LNCap در شرایط *in vivo* و *in vitro* می شود در حالی که بیمار با محروم سازی از آندروژن تحت درمان می باشد؛ IL6 با افزایش بیان mRNA و Androgen-regulated prostate-specific antigen باعث افزایش رشد سلول ها می شود (۷-۹). IL-6 در سلول های سرطانی پروستات باعث افزایش فعالیت آندروژن رسپتور و تحریک بیان ژن پاسخ دهنده به آندروژن مانند (Prostate-Specific Antigen= PSA) می گردد (۹-۷،۱۱). IL-6 در هر دو لاین سلولی LNCap و DU-145 فعالیت آندروژن رسپتور متصل شونده به هسته را در غلظت پایینی از آندروژن افزایش می دهد و در نتیجه باعث افزایش نسخه برداری در هسته می شود (۱۱-۸، ۱۳). IL-6 باعث ایجاد و فعال شدن آندروژن رسپتوری می شود که مستقل از لیگاند عمل کرده و در

غیاب آندروژن اثر سینرژیک آندروژن رسپتور را ایفا می کند. پس IL-6 به واسطه فعال کردن آندروژن رسپتور اثر خود را ایفا می کند (۱۲، ۱۳). IL-6 از سلول های سرطان پروستات در برابر آپوپتوز و مرگ ناشی از توقف سیکل سلولی که به علت محروم سازی از آندروژن ایجاد می شود، محافظت می کند (۱۴، ۱۵). از سوی دیگر IL-6 بیان ژن های کد کننده آنزیم های Steroidogenic مانند AKR1C3 و HSD3B2 را افزایش می دهد و در نتیجه منجر به سنتز آندروژن داخل پروستات می شود و به این ترتیب آندروژن مورد نیاز آندروژن رسپتور را تأمین می کند (۴، ۱۶). IL-6 می تواند چندین مسیر سیگنالی مهم از جمله ERK، JAK-Stat، Src، MAPK، catenin، erbB1-3 و PI3k-Akt را در سلول های سرطان پروستات فعال کند و به این طریق باعث ایفای اثرات خود و باعث پیشرفت این سرطان گردد (۲۰-۱۷). مطالعات قبلی نشان می دهند که در مهار IL-6 به وسیله Anti-IL-6 (CNTO 328) هیچ تفاوتی در درجه آندروژن رسپتور در دو فنوتیپ وابسته و مستقل از هورمون ایجاد نمی شود؛ اما مهار IL-6 هم باعث افزایش آپوپتوز و هم باعث مهار تکثیر سلول در تومور پروستات می شود و نیز از بیان کوفاکتورهای آندروژن رسپتور جلوگیری می کند و به این ترتیب از تبدیل فنوتیپ وابسته به هورمون به فنوتیپ مستقل از هورمون جلوگیری می کند (۴، ۶، ۲۱). این اطلاعات متقاعد کننده، پیشنهاد می کند که سیگنال های IL-6 می توانند به عنوان یک هدف ایده آل برای سرکوب سرطان پروستات مورد توجه قرار گیرند؛ بنابراین، بررسی کاهش بیان IL-6 و مهار مسیرهای سیگنالی آن می تواند در مهار پیشرفت سرطان پروستات موثر باشد.

کارواکرول (Carvacrol) یک ترکیب Monoterpene phenol می باشد که در روغن های فراری مانند *Thymus vulgaris* (آویشن باغی)، *Carum copticum* (زینان) و *Origanum vulgare* (مرزنجوش) وجود دارد.

ترکیبات و مواد غذایی حاوی کارواکرول صدها سال است که توسط انسان مصرف می شود و هیچ اثر سمی تا به امروز برای آن شناخته نشده است (۲۲). کارواکرول به واسطه خاصیت آنتی اکسیدانی و توانایی اتصال به باکتری ها و رستپورهای انسانی باعث اعمال اثر ضد تکثیر بر روی سلول های سرطانی مختلف می شود (۲۴،۲۳). علاوه بر این، مطالعات نشان می دهند که کارواکرول باعث احیای سلول های کبدی در موش های مبتلا به هپاتکتومی (Hepatectomy) می شود و با خاصیت ضد التهابی خود باعث کاهش بیان IL-6 و TNF- α می گردد (۲۶،۲۵). مطالعات دیگر نشان می دهند که کارواکرول می تواند آنزیم Cyclooxygenase-2 (COX-2) را که در پدیده التهاب نقش دارد، مهار کند (۲۷). در سلول های سرطان کبد (HepG2)، کارواکرول در غلظت موثر خود از طریق کاهش Erk1/2 فسفوریله منجر به کاهش رشد و تکثیر این سلول ها می شود و نیز از طریق افزایش پروتئین کیناز P38 منجر به فعال شدن آپوپتوز می گردد (۲۶). تأثیر کارواکرول بر روی سرطان پروستات کمتر مورد بررسی قرار گرفته است و در جدیدترین تحقیقات در رابطه با کارواکرول بر سلول های سرطان پروستات، دیده شده که این دارو باعث کاهش زیست پذیری این سلول ها به واسطه فعال کردن آپوپتوز می شود. این یافته ها نشان می دهند که این ترکیب می تواند به عنوان یک ماده درمانی بالقوه در درمان سرطان پروستات مورد بررسی و تحقیق قرار گیرد (۲۸).

با توجه به مطالب ذکر شده، هدف از این مطالعه بررسی اثر غلظت های مختلف کارواکرول بر بیان ژن IL-6، پروتئین های Akt فسفریله، Stat3 فسفریله و Erk فسفریله مسیرهای سیگنالی در سلول های سرطان پروستات (DU-145) و تأثیر گذاری بر قدرت تهاجم این سلول ها می باشد.

روش بررسی:

سلول های DU-145 از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. RPMI 1640، ترپسین ۰/۲۵٪، Fetal bovine serum (South America) از شرکت Gibco خریداری شدند.

Carvacrol، (Dimethyl Sulfoxide= DMSO) و ماتریژل Sigma (ESH Sarcoma Matrigel) از شرکت خریداری گردیدند. Master PCR از شرکت SYBR Green PCR، Cinna Gene PCR Master Kit، شرکت GeNet Bio Global Gene Network، غشاء (Polyvinylidene difluoride= PVDF) و BM Blue POD Substrate Precipitating از شرکت Roche و MTT از شرکت (BIO-IDEA) خریداری شدند. کیت ایترلوکین-۶ از شرکت AviBion، کیت BIOZOL Total RNA Extraction Reagent از شرکت (Bio Flux) و کیت cDNA سنتتاز از شرکت AccuPower (Rocket ScriptTM RT premix) تهیه گردید. آنتی بادی های Anti p-AKT1 (phospho S473)، Anti p-ERK1+ERK2 (phospho T202+Y204)، Anti-beta Actin antibody، Anti p-stat3 (phospho Y705) و (HRP)Goat Anti-Rabbit IgG H&L از شرکت Abcam خریداری شدند.

در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی، لاین سلول های سرطان پروستات انسانی DU-145 از انستیتو پاستور خریداری گردید. این سلول ها در محیط کشت محتوی RPMI-1640 غنی شده با ۱۰٪ L-glutamine (Fetal bovine serum= FBS)، پنسیلین ۱۰^۲ u/ml و استرپتومایسین ۰/۸mg/ml (Gibco, Canada) و تحت شرایط کشت استاندارد (دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، رطوبت ۹۵٪ و ۵٪CO₂) کشت داده شدند (۳).

به منظور به دست آوردن زیست پذیری سلول ها (Cell viability) در برابر اثرات سمی کارواکرول آزمون MTT انجام شد. در هر چاهک سلول های سرطانی DU-145 با تراکم ۵×۱۰^۳ در محیط RPMI حاوی ده درصد FBS در یک پلیت ۹۶ خانه ای تهیه شد و به مدت یک شب در انکوباتور قرار داده شد. بعد از آن محیط کشت با محیط حاوی غلظت های مختلف کارواکرول محلول در DMSO (در محدوده ۰ تا ۸۰۰ میکرومولار) تعویض گردید و به مدت ۴۸ ساعت در

انکوباتور قرار گرفت. حداکثر غلظت DMSO در محیط کشت برای جلوگیری از آسیب سلولی ۰/۱٪ بود. بعد از گذشت زمان مورد نظر محیط کشت حاوی دارو از چاهک های پلیت حذف گردید و چاهک ها با PBS شستشو داده شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از RPMI فاقد رنگ به هر چاهک اضافه شد و به دنبال آن ۱۰ μL از محلول MTT با غلظت ۱۲ mM به هر چاهک از پلیت اضافه گردید و پلیت به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. سپس محیط حذف و در ادامه ۵۰ μL از DMSO به هر چاهک اضافه گردید تا بلورهای Formazan با DMSO به صورت محلول درآید؛ سپس با استفاده از دستگاه پلیت ریدر (Stat Fax-2100, Spain) در طول موج ۵۷۰ نانومتر جذب نوری اندازه گیری شد. این آزمون برای هر غلظت از کارواکروپل ۳ بار به صورت Triplicate انجام گرفت. درصد زیست پذیری سلول های تحت درمان در مقایسه با سلول های درمان نشده طبق فرمول زیر اندازه گیری و غلظت مهارکنندگی ۵۰ درصد رشد سلول ها (IC₅₀) محاسبه شد (۲۹، ۳۰):

"۱۰۰×جذب نوری گروه کنترل/جذب نوری گروه درمان شده"
سلول های DU-145 به تعداد ۲×۱۰^۵ سلول در هر چاهک در حجم ۲ml با RPMI حاوی ۱۰٪ FBS به پلیت ۶ خانه ای منتقل گردید و پلیت به مدت یک شب در انکوباتور قرار داده شد؛ سپس سلول ها تحت تأثیر غلظت های ۴۸۰، ۲۳۰، ۱۵۰ و ۴۳۰ میکرومولار از کارواکروپل به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند. بعد از گذشت زمان مذکور محیط کشت روی سلول ها جمع آوری شد و با استفاده از کیت IL-6 طبق دستور العمل شرکت سازنده کیت میزان پروتئین IL-6 به روش ELISA اندازه گیری شد (۴).

جهت بررسی بیان ژن IL-6 سلول های DU-145 در پلیت ۶ خانه ای با تراکم ۲×۱۰^۵ سلول در هر چاهک ریخته شدند؛ سپس سلول ها بعد از گذشت یک شب تحت تأثیر غلظت های ۴۸۰، ۲۳۰، ۱۵۰ و ۴۳۰ میکرومولار از داروی کارواکروپل به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند. بعد از گذشت ۴۸ ساعت سلول ها به کمک ترپسین جدا شده و یک بار با PBS شستشو داده شدند. استخراج RNA Total

سلول های DU-145 برای هر غلظت از دارو به طور جداگانه با استفاده از BIOZOL انجام گرفت. غلظت RNA با استفاده از Spectrophotometer Nano Drop (Thermo Scientific Nanodrop200) در طول موج ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر و نیز در ۲۶۰ نانومتر به ۲۳۰ نانومتر اندازه گیری شد. برای سنتز cDNA از RNA هایی استخراج شده ای استفاده شد که نسبت جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر آن ها بین ۱/۸ تا ۲ و نسبت جذب نوری ۲۶۰/۲۳۰ نانومتر آن ها بین ۱/۷ تا ۱/۹ بود. قبل از انجام واکنش RT Reaction، کل RNA ها با استفاده از آنزیم DNase عاری از DNA گردیدند. به منظور انجام واکنش Reverse-transcription RT-PCR در جهت تولید cDNA، ۵ میکرولیتر از RNA را با استفاده از آنزیم Rocket Script Reverse Transcription و بر اساس دستور کار کیت و با استفاده از پرایمر ۱۸ (Oligo (dT) به cDNA تبدیل گردید. آماده سازی cDNA برای هر نمونه واکنش Real-time PCR با استفاده از SYBR Green PCR و Master PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر در میکروتیوپ های ۰/۲ میکرولیتر به فرم Triplicate انجام گرفت. جهت انجام PCR هر کدام به تعداد ۳۵ چرخه که دارای مراحل واسرشتگی (Denaturation) به مدت ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد و مرحله اتصال پرایمر (Annealing) به مدت ۲۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد و همچنین مرحله بسط (Extension) به مدت ۲۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد حرارت داده شد و ژن GAPDH به عنوان یک سیستم کنترل داخلی (Housekeeping Gene) و ژن IL-6 به عنوان ژن اصلی (Interest gene) در نظر گرفته شدند. برای انجام واکنش از دستگاه Rotor-Gene (RG3000 Corbett Research) استفاده گردید. بازده واکنش با پرایمر اختصاصی ژن GAPDH در غلظت های ۱، ۰/۱، ۰/۰۱، ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۰۱ به دست آمد. آنالیز CT های به دست آمده با استفاده از روش Fold change (2^{-CT}) و با در نظر گرفتن بازده ای برابر با ۹۳٪ انجام شد (۱۵) و داده های به دست آمده با استفاده از نرم افزار Prism5 بررسی شد.

توالی پرایمرهای GAPDH و IL-6 مورد استفاده به ترتیب به شرح زیر بود:

Forward: 5' ACACCCACTCCTCCACCTTTG 3'
Reverse: 5' TCCACCACCCTGTTGCTGTAG 3'
Forward: 5' GGTACATCCTCGACGCGCATCT 3'
Reverse: 5' GTGCCTCTTTGCTGCTTTTAC 3'

مراحل Western blot پروتئین های مسیر

سیگنالی IL6: سلول های درمان شده با غلظت های مختلف کارواکرول را با استفاده از بافر RIPA سرد (۵۰ mM Tris-HCl pH=۸، ۱۵۰ mM Sodium chloride، ۱٪ Triton 100X، ۰/۵٪ Sodium deoxycholate، ۰/۱٪ SDS، ۱ mM EDTA، ۰/۱٪ Sodium azide) که همراه با مهارکننده های پروتئاز و فسفاتازمی باشد (۱ mM PMSF و ۸۰ μM glycerophosphate - Sodium orthovanadate، ۵۰ mM NaF) لیز کرده در طی این فرایند بعد از اضافه کردن بافر RIPA سرد به سلول ها، آن ها را به مدت ۳۰ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد قرار داده؛ سپس نمونه ها در سانتریوفیوژ دور ۱۲۰۰۰ RPM و در ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریوفیوژ شدند. بعد از پایان سانتریوفیوژ، محلول روی رسوب به داخل یک میکروتیوپ جدید و سرد (که قبلاً روی یخ گذاشته شده بود) انتقال داده شد و با استفاده از دستگاه Nano Drop غلظت پروتئین های محلول بر حسب μg/μl خوانده شد. سپس، محلول پروتئینی با غلظت ۲۴ μg/μl با لودینگ بافر ۶X به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. به منظور جدا شدن پروتئین ها بر اساس وزن مولکولی SDS-Polyacrylamide ژل الکتروفورز صورت گرفت. سپس، پروتئین ها از روی ژل بر روی غشاء Polyvinylidene difluoride (PVDF) انتقال داده شدند. به منظور حذف باندهای غیر اختصاصی، غشاء PVDF به مدت یک شب در ۴ درجه سانتیگراد در شیر خشک بدون چربی ۲/۵٪ در Tris-Buffered Saline (TBST) همراه با ۰/۱٪ Tween-20 و یا با ۰/۱٪ TBST در ۲/۵٪ (BSA) bovine Albumin serum

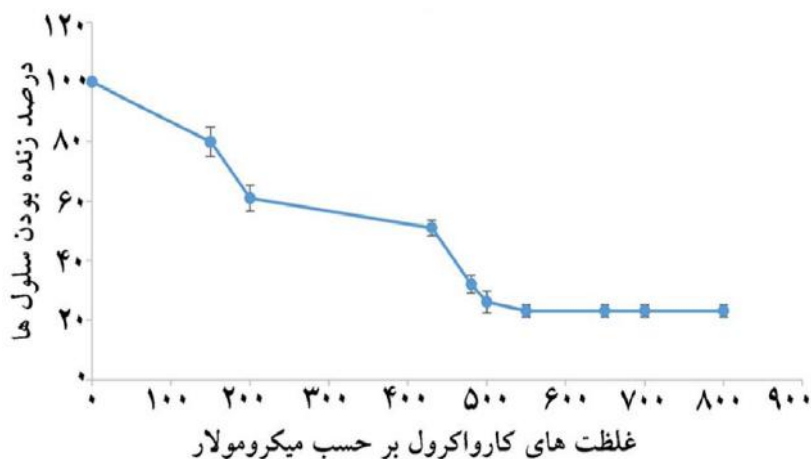
بلوکه گردید. متعاقباً غشاء با آنتی بادی اختصاصی خود که شامل Anti p-AKT1 با غلظت ۱۵:۱۰۰۰۰، Anti p-ERK1/2 با غلظت ۱۵:۱۰۰۰۰، و Anti p-stat3 با غلظت ۱:۱۰۰۰۰ به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق بر روی شیکر قرار داده شد. آنتی بادی اکتین نیز با غلظت ۱:۱۰۰۰۰ به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. متعاقباً نمونه ها به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق و با غلظت ۲:۱۰۰۰۰ با آنتی بادی ثانویه H&L Goat Anti-Rabbit IgG (HRP) شیکر شدند. سپس پروتئین های Immunoreactive با اضافه کردن سوبسترا (BM Blue POD Substrate) و ایجاد Precipitation به صورت باند اختصاصی آشکار شدند (۳۲،۳۱۸).

آزمون بررسی اثر کارواکرول بر قدرت تهاجم سلول های DU145 جهت بررسی قدرت تهاجمی سلول های سرطانی پروستات انجام شد که در آن از Transwell و پلیت ۲۴ خانه ای و غشایی از جنس ماتریژل با غلظت ۱mg/ml استفاده شد. Chamber توسط ماتریژلی با غلظت ۱ mg pre size پوشیده شد. به طور خلاصه، سلول های DU145 تیمار نشده همراه با سلول هایی که با غلظت های ۱۵۰ و ۴۳۰ میکرومولار از کارواکرول به مدت ۴۸ ساعت درمان شده بودند را توسط ترپسین جدا و در یک محیط کشت حاوی ۰/۱٪ FBS حل شدند. مدیا حاوی ۱۰FBS درصد را به عنوان chemoattractant در chamber پایینی به کار برده و سپس سلول ها با تراکم ۵×۱۰^۴ سلول در حجم ۵۰ میکرولیتر با محیط کشت حاوی ۰/۱٪ FBS بر روی chamber بالایی انتقال داده شدند. سپس آن ها به مدت ۱۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. در پایان انکوباسیون سلول هایی که توانایی مهاجرت یا به عبارتی تهاجم به سطح پایینی غشاء را داشته اند، توسط گلو تار آلدئید ۵٪ فیکس گردیدند و با محلول تولوئیدن بلو ۰/۵٪ رنگ آمیزی شدند. بعد از پایان رنگ

یافته ها:

بررسی اثر کارواکرویل بر روی سلول های سرطانی DU-145 در رنج ۰ تا ۸۰۰ میکرومولار نشان داد، در غلظت $150\mu\text{M}$ از کارواکرویل، ۸۰٪ از سلول های DU-145 توانایی زیست پذیری خود را حفظ کرده بودند. این میزان بقاء با افزایش غلظت کارواکرویل تقلیل یافته به طوری که در غلظت $230\mu\text{M}$ درصد بقاء سلول ها ۵۸٪ بود (نمودار شماره ۱). برآورد غلظت IC_{50} کارواکرویل با فاصله اطمینان ۹۵٪ معادل $406/2\mu\text{M}$ (محدوده ۳۶۷ و ۴۴۳ میکرومولار) محاسبه شد.

آزمیزی، سلول های موجود در سطح بالایی غشاء که توانایی مهاجرت به سطح پایینی غشاء را نداشته اند با دقت توسط سواب کتانی حذف گردیدند. سلول هایی که در قسمت پایینی غشاء بودند به صورت Triplicate در ۳ تا ۴ میدان تصادفی توسط میکروسکوپ نوری شمارش شدند (۳۳، ۳۴). داده های با استفاده از نرم افزارهای SPSS و Prism5 و با آزمون نا پارامتریک Kruskal-Wallis test بررسی شدند. مقادیر با $P < 0/05$ ، در بین گروه ها معنی دار در نظر گرفته شدند.

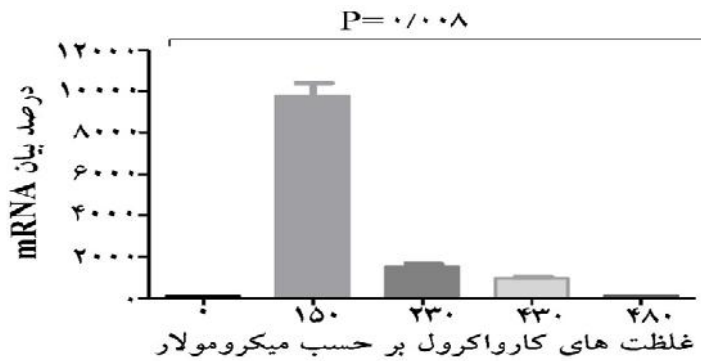


نمودار شماره ۱: اثر کارواکرویل بر زیست پذیری و آپوپتوز سلول های سرطانی DU-145

سلول های DU-145 به مدت ۴۸ ساعت تحت تأثیر غلظت های ۰ تا ۸۰۰ میکرومولار کارواکرویل قرار گرفتند و سپس زیست پذیری و آپوپتوز این سلول ها توسط آزمون MTT مورد بررسی قرار گرفت. میانگین و انحراف معیار هر آزمون مربوط به سه آزمایش مستقل و سه تکرار می باشد.

میزان 1549 و $972/2$ درصد نسبت به نمونه کنترل رسید. در غلظت بالاتر از IC_{50} بیان ژن کاهش یافت؛ به طوری که در غلظت $480\mu\text{M}$ بیان ژن به $136/7$ درصد نمونه کنترل رسید که این میزان در محدوده بیان ژن نمونه تیمار نشده است (نمودار شماره ۲).

در غلظت $150\mu\text{M}$ از کارواکرویل بیان ژن IL-6 یک افزایش قابل توجه ای به میزان $9690/4$ درصد نسبت به نمونه کنترل دارد ($P > 0/05$)؛ اما در غلظت های بعدی بیان ژن روند کاهشی را نشان داد، به گونه ای که در غلظت های 230 و 430 میکرومولار بیان ژن به ترتیب به

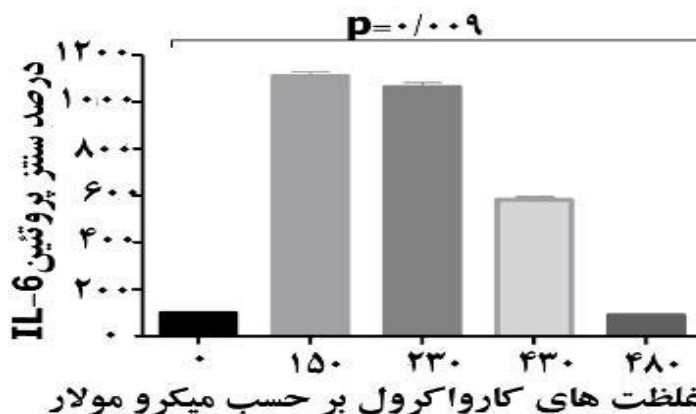


نمودار شماره ۲: اثر کارواکرول بر بیان ژن پروتئین IL-6

Total RNA سلول های سرطانی DU-145 پس از تیمار به مدت ۴۸ ساعت با غلظت های مختلف کارواکرول، استخراج شده و با استفاده از Real time RT PCR تعیین کمی گردیدند. میانگین هر آزمون مربوط به سه آزمایش مستقل و با سه تکرار می باشد. نتایج بر حسب نسبت به گروه کنترل بیان گردیده است.

روند نزولی را پیدا کرد، به طوری که در غلظت های ۲۳۰ و ۴۳۰ میکرومولار به ترتیب به میزان ۹۶۳/۳ و ۴۸۲/۹ درصد رسید. سنتر IL-6 در غلظت ۴۸۰μM با روند نزولی قابل توجهی ادامه یافته و به میزان ۹۰/۹ درصد نسبت به نمونه کنترل کاهش نشان داد (نمودار شماره ۳).

در شرایطی که سنتر پروتئین IL-6 در نمونه کنترل ۱۰۰٪ در نظر گرفته شد، در غلظت ۱۵۰μM از کارواکرول سنتر پروتئین IL-6 به طور معنی داری ($P < 0.05$) به میزان ۱۰۰۹/۹ درصد نسبت به نمونه کنترل افزایش یافت. با افزایش غلظت کارواکرول سنتر پروتئین

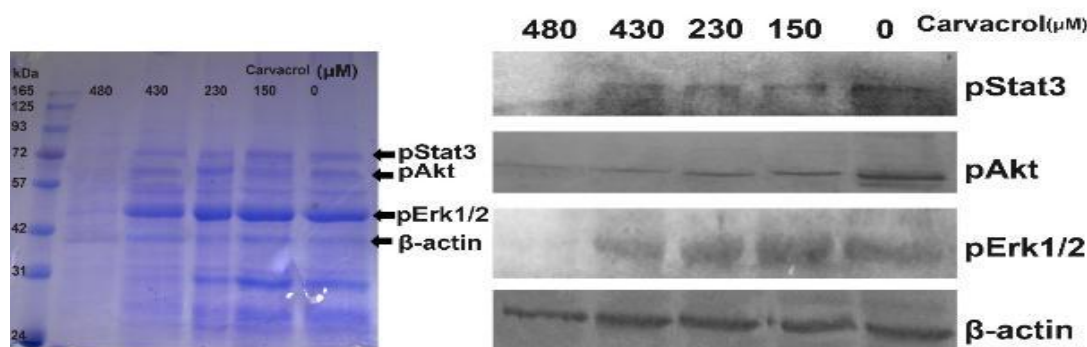


نمودار شماره ۳: اثر کارواکرول بر سنتر و ترشح پروتئین IL-6 در سلول های سرطانی DU-145

سلول های سرطانی DU-145 با غلظت های مختلف کارواکرول به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند و سپس محلول روی سلول ها جهت تعیین IL-6 به روش الیزا استفاده شد. میانگین هر آزمون مربوط به سه آزمایش مستقل و سه تکرار می باشد. نتایج بر حسب درصد نسبت به گروه کنترل بیان گردیده است.

۴۸۰μM هر سه پروتئین های مسیر سیگنالی فوق را به طور قابل توجهی کاهش داد. البته این اثر کاهشی برای Akt نسبت به دو مسیر دیگر تاحدی کمتر بود (تصویر شماره ۱).

کارواکرول در غلظت های ۱۵۰، ۲۳۰ و ۴۳۰ میکرومولار بر مسیرهای سیگنالی Akt، ERK1/2 و STAT3 یک تأثیر کاهشی نسبی داشت؛ اما در غلظت

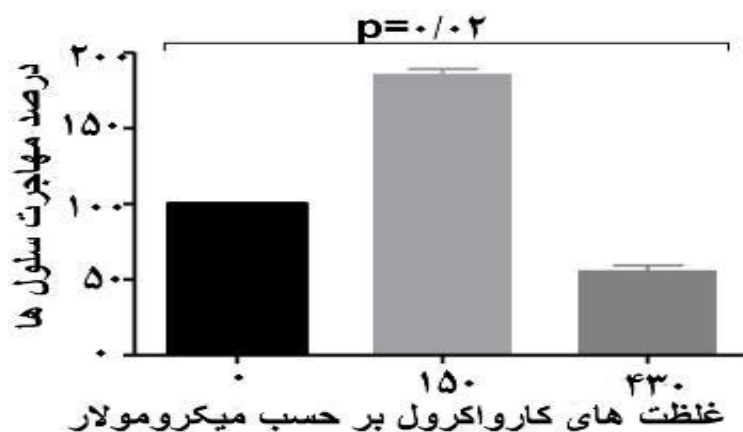


تصویر شماره ۱: اثر مهاري کارواکرول بر پروتئين های مسير سيگنالي IL-6

سلول های سرطانی DU-145 با غلظت های مختلف کارواکرول به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند و پس از استخراج پروتئين ها، پروتئين های مسير سيگنالي سلولي IL-6 شامل pStat3، pAkt و pErk همراه با کنترل داخلي β -actin با تکنیک Western blot مورد بررسی قرار گرفتند. شکل سمت چپ پروتئين های جدا شده و رنگ آمیزی شده با کوماسی بلو بر روی ژل SDS-Polyacrylamide را نشان می دهد. شکل سمت راست پروتئين های مسير سيگنالي در Western blot با استفاده از آنتی بادی اختصاصی را نشان می دهد.

۱۵۰ μ M توانایی مهاجرت سلول های DU-145 را نسبت به نمونه های تیمار نشده به میزان ۱۸۵/۶۶٪ افزایش داده؛ اما در غلظت ۴۳۰ μ M توانایی تهاجم و مهاجرت سلول های DU-145 به طور معنی داری به میزان ۵۵٪ نسبت به سلول های تیمار نشده کاهش یافت ($P < ۰/۰۵$).

در بررسی اثر کارواکرول بر قدرت مهاجرت سلول های DU-145، توانایی مهاجرت سلول های درمان شده با غلظت های ۱۵۰ و ۴۳۰ میکرومولار همراه با سلول های تیمار نشده در آزمون Invasion assay مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد (نمودار شماره ۴)، کارواکرول به طور معنی داری در غلظت



نمودار شماره ۴: اثر مهاري کارواکرول بر توانایی مهاجرت سلول های سرطانی DU-145

توانایی مهاجرت و تهاجم سلول های سرطانی DU-145 پس از درمان به مدت ۴۸ ساعت با غلظت های مختلف کارواکرول در آزمون Invasion مورد ارزیابی قرار گرفتند. میانگین هر آزمون مربوط به سه آزمایش مستقل و سه تکرار می باشد. نتایج بر حسب درصد نسبت به گروه کنترل بیان گردیده است.

بحث:

در بررسی اثر کارواکرویل بر زیست پذیری سلول های DU-145 برآورد مقدار IC_{50} با فاصله اطمینان ۹۵٪ برابر ۴۰۶/۲ میکرو مولار بود. در مطالعات قبلی که بر روی سلول های Mouse embryo 3T3-L1 انجام شده است، IC_{50} کارواکرویل معادل ۲۷۳ میکرو مولار گزارش شده است (۷). در مطالعه دیگری بر روی سلول های (Human non-small cell lung cancer= rNSCLC) محدوده IC_{50} معادل ۵۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرو مولار برای کارواکرویل گزارش شده است (۳۵) که نشان می دهد کارواکرویل در سلول های مختلف سرطانی داری یک رنج اثر برای IC_{50} می باشد؛ اما علت تفاوت در رنج این محدوده با نمونه مورد بررسی ما احتمالاً می تواند ناشی از تفاوت در نوع سلول ها و نیز نحوه به دست آوردن زیست پذیری سلول ها باشد.

نتایج ما نشان می دهند که بیان ژن IL-6 در غلظت $150 \mu M$ از کارواکرویل به طور معنی داری به میزان ۹۶۹۰/۴ درصد نسبت به نمونه کنترل افزایش یافته بود؛ اما در غلظت های بعدی بیان ژن روند کاهشی را نشان داد به گونه ای که در غلظت های ۲۳۰ و ۴۳۰ میکرو مولار، بیان ژن به ترتیب به ۱۵۴۹ و ۹۷۲/۲ درصد نسبت به نمونه کنترل رسید؛ ولی در این فاز هنوز بیان ژن IL-6 بالاتر از نمونه کنترل بود. بیان ژن IL-6 در سلول های DU-145 در غلظت بالاتری از IC_{50} یعنی معادل $480 \mu M$ کارواکرویل منجر به سنتز پروتئین IL-6 به میزان ۱۳۶/۷ درصد نسبت به نمونه تیمار نشده گردید. این یافته نشان می دهند که اثر کاهشی کارواکرویل بر بیان ژن IL-6 و سنتز پروتئین آن در غلظت های بالاتری از IC_{50} می باشد. هر چند با افزایش غلظت کارواکرویل افزایش بیان ژن و پروتئین IL-6 مشاهده می شود که با توجه به اثر ضد آپوپتوزی پروتئین IL-6 به نظر، با اثر آپوپتوزی کارواکرویل متضاد است؛ ولی کارواکرویل تنها این اثر را ندارد بلکه اثرات دیگر آن خصوصاً در القاء استرس اکسیداتیو با افزایش گونه های فعال

اکسیژن (generation of oxygen species= ROS) اکسیداتیو، فعال سازی کاسپاز ۳، کاهش بیان ژن Bcl₂، تخریب (PARP) Poly (ADP-ribose) polymerase، افزایش بیان ژن سایر پروتئین ها و عوامل موثر در استرس اکسیداتیو که منجر به آپوپتوز می گردند نیز می بایستی در نظر گرفته شوند و به عبارت دیگر می بایستی براین کل در نظر گرفته شود (۲۶). در این مطالعه به دلیل محدود بودن بودجه طرح تحقیقاتی، بسیاری از پارامترها و عوامل دیگر خصوصاً عوامل درگیر در استرس اکسیداتیو که می توانند تحت تأثیر کارواکرویل قرار گیرند و باعث القاء آپوپتوز گردند، بررسی نشده اند و بنابراین پیشنهاد می گردد در تحقیقات بعدی اثر کارواکرویل بر تغییرات عوامل مذکور بررسی تا اثرات مولکولی که منجر به اثر آپوپتوزی کارواکرویل می شود، بهتر شناسایی شوند؛ همچنین، کارواکرویل اثر ضد التهابی خود در ماکروفاژهای خوک را با کاهش سایتوکین های قبل از التهاب مانند TNF- و IL-1 اعمال می کند (۳۶) که این اثر ضد التهابی بر روی سلول های Hela نیز دیده شده است (۳۷)؛ همچنین، مطالعات قبلی نشان داده اند که فرم فسفوریله Akt در ممانعت از آپوپتوز نقش دارد (۳۹،۳۸) و همانطور که در تصویر شماره ۱ دیده می شود کارواکرویل در غلظت $150 \mu M$ باعث کاهش قابل توجه فرم فسفوریله Akt نسبت به کنترل شده است؛ بنابراین، با توجه به مطالب فوق تأثیر آپوپتوزی کارواکرویل در سلول های DU-145 احتمالاً به واسطه کاهش فرم فسفوریله Akt و خاصیت ضد التهابی، القاء استرس اکسیداتیو با افزایش گونه های فعال اکسیژن و فعال سازی کاسپاز ۳ می باشد.

IL-6 به واسطه مسیرهای سیگنالی Stat3 و Akt و MAPK و به ویژه مسیر Stat3، اثرات خود را بر پیشرفت سرطان پروستات اعمال می کند (۴۱،۴۰،۴). در این تحقیق مشخص شد که کارواکرویل در غلظت بالاتر

از IC_{50} ($480 \mu M$) منجر به کاهش سیگنال های القائی IL6 شامل ERK1/2، STAT3 و Akt می گردد. این اثر کاهشی برای مسیر سیگنالی Akt نسبت به دو مسیر دیگر کمتر بود. مطالعات اخیر نشان می دهند که در بافت توموری پروستات تفاوت چشمگیری در بیان فرم فسفوریله Akt (فرم فعال) نسبت به بافت نرمال وجود دارد و مهار این مسیر باعث القاء آپوپتوز می گردد ($39,38$)؛ همچنین مهار فعالیت Janus Kinase منجر به مهار فعالیت ساختمانی Stat3 و مهار رشد سلول های سرطانی پروستات می گردد (41). از طرف دیگر، ارتباط سیگنالی بین PI3k/Akt و MAPK/Erk باعث بقاء و رشد سلول های سرطان پروستات می شود (39). علاوه بر این، کارواکروئول در سلول های سرطانی کبد HepG2 در غلظت موثر خود باعث کاهش فرم فسفوریله ERK1/2 و بدین طریق منجر به کاهش رشد و تکثیر سلول های HepG2 می گردد؛ همچنین کارواکروئول با فعال کردن مسیریروزین کیناز MAPK و افزایش P38 باعث فعال شدن آپوپتوز در این سلول ها می شود (26). با توجه به مطالب فوق می توان نتیجه گرفت که کارواکروئول با کاهش پروتئین های مسیرهای سیگنالی ERK1/2، STAT3 و Akt اثرات القائی IL-6 را کاهش داده و منجر به فعال شدن آپوپتوز و کاهش زیست پذیری و بقاء این سلول ها می گردد که با مطالعات ذکر شده فوق همخوانی دارند (26). این مطالب نشان می دهند که مهار مسیرهای القایی IL-6 می تواند به عنوان یک هدف امید بخش، در درمان سرطان پروستات مورد توجه قرار گیرد.

در بررسی تأثیر کارواکروئول بر توانایی مهاجرت سلول های DU-145، این ترکیب در غلظت $150 \mu M$ همزمان با افزایش میزان سنتز پروتئین IL-6 توانایی مهاجرت این سلول ها را به میزان $185/66\%$ نسبت به نمونه درمان نشده افزایش می دهد؛ اما در غلظت 430 میکرو مولار میزان مهاجرت این سلول ها به شدت کاهش یافته و این کاهش به 55% نمونه تیمار نشده رسید. در مطالعات قبلی مشاهده گردید که در صورت غیر فعال شدن و یا کاهش (Phosphatase that antagonizes the activation of PI3k= PTEN)

فعالیت Akt و در نتیجه وقوع متاستاز افزایش می یابد (39)؛ همچنین رسپتورهای P2Y (G protein-coupled) به وسیله مسیرهای سیگنالی ERK1/2 و تیروزین کیناز P38 باعث افزایش قدرت تهاجم سلول های سرطان پروستات می شوند. با افزایش فعالیت ERK1/2 و پروتئین کیناز P38 به وسیله Agonist P2Y قدرت تهاجم سلول های سرطان پروستات افزایش می یابد (42). از طرف دیگر آنتی اکسیدان ها قادرند از طریق مهار P38 MAPK و یا کاهش بیان IL-6 مسیرهای سیگنالی آن مانند مسیر Akt در سلول های DU-145 منجر به کاهش توانایی متاستاز در این سلول ها گردند ($33,4$)؛ بنابراین با توجه به اینکه کارواکروئول در این تحقیق در غلظت موثر خود تأثیر بالقوه در کاهش فعالیت مسیرهای سیگنالی فوق داشته، می توان نتیجه گرفت که بخشی از کاهش توانایی تهاجم و مهاجرت سلول های DU-145 به علت کاهش پروتئین های مسیرهای سیگنالی فوق می باشد.

نتیجه گیری:

نتایج این تحقیق نشان می دهند که کارواکروئول از طریق کاهش پروتئین های مسیرهای سیگنالی می تواند باعث القاء آپوپتوز و کاهش رشد، تکثیر و توانایی مهاجرت سلولی در رده سلول های DU-145 گردد؛ بنابراین، کارواکروئول در غلظت های موثر خود می تواند به عنوان یک ماده درمانی سودمند در درمان سرطان پروستات مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی:

این تحقیق مربوط به بخشی از پایان نامه خانم مهناز کلوشادی دانشجویی کارشناسی ارشد بیوشیمی به شماره ثبت طرح تحقیقاتی ۱۲۰۳ معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد است؛ همچنین، بدینوسیله پژوهشگران مراتب تقدیر و تشکر خود را از پرسنل محترم مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد که در اجرای این تحقیق ما را یاری نمودند، ابراز می دارند.

منابع:

1. Veluri R, Singh RP, Liu Z, Thompson JA, Agarwal R, Agarwal C. Fractionation of grape seed extract and identification of gallic acid as one of the major active constituents causing growth inhibition and apoptotic death of DU145 human prostate carcinoma cells. *Carcinogenesis*. 2006; 27(7): 1445-53.
2. Chen KC, Hsieh CL, Peng CC, Hsieh-Li HM, Chiang HS, Huang KD, et al. Brain derived metastatic prostate cancer DU-145 cells are effectively inhibited in vitro by guava (*Psidium guajava* L.) leaf extracts. *Nutr Cancer*. 2007; 58(1): 93-106.
3. Kaur M, Velmurugan B, Rajamanickam S, Agarwal R, Agarwal C. Gallic acid, an active constituent of grape seed extract, exhibits anti-proliferative, pro-apoptotic and anti-tumorigenic effects against prostate carcinoma xenograft growth in nude mice. *Pharm Res*. 2009; 26(9): 2133-40.
4. Chun JY, Tummala R, Nadiminty N, Lou W, Liu C, Yang J, et al. Andrographolide, an herbal medicine, inhibits interleukin-6 expression and suppresses prostate cancer cell growth. *Genes Cancer*. 2010; 1(8): 868-76.
5. Okamoto M, Lee C, Oyasu R. Interleukin-6 as a paracrine and autocrine growth factor in human prostatic carcinoma cells in vitro. *Cancer Res*. 1997; 57(1): 141-6.
6. Borsellino N, Belldgrun A, Bonavida B. Endogenous interleukin 6 is a resistance factor for cis-diamminedichloroplatinum and etoposide-mediated cytotoxicity of human prostate carcinoma cell lines. *Cancer Res*. 1995; 55(20): 4633-9.
7. Cho S, Choi Y, Park S, Park T. Carvacrol prevents diet-induced obesity by modulating gene expressions involved in adipogenesis and inflammation in mice fed with high-fat diet. *J Nutr Biochem*. 2012; 23(2): 192-201.
8. Lee SO, Lou W, Hou M, de Miguel F, Gerber L, Gao AC. Interleukin-6 promotes androgen-independent growth in LNCaP human prostate cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2003; 9(1): 370-6.
9. Hobisch A, Eder IE, Putz T, Horninger W, Bartsch G, Klocker H, et al. Interleukin-6 regulates prostate-specific protein expression in prostate carcinoma cells by activation of the androgen receptor. *Cancer Res*. 1998; 58(20): 4640-5.
10. Debes JD, Comuzzi B, Schmidt LJ, Dehm SM, Culig Z, Tindall DJ. P300 regulates androgen receptor-independent expression of prostate-specific antigen in prostate cancer cells treated chronically with interleukin-6. *Cancer Res*. 2005; 65(13): 5965-73.
11. Malinowska K, Neuwirt H, Cavarretta IT, Bektic J, Steiner H, Dietrich H, et al. Interleukin-6 stimulation of growth of prostate cancer in vitro and in vivo through activation of the androgen receptor. *Endocr Relat Cancer*. 2009; 16(1): 155-69.
12. Culig Z, Bartsch G, Hobisch A. Interleukin-6 regulates androgen receptor activity and prostate cancer cell growth. *Mol Cell Endocrinol*. 2002; 197(1-2): 231-8.
13. Culig Z, Steiner H, Bartsch G, Hobisch A. Interleukin-6 regulation of prostate cancer cell growth. *J Cell Biochem*. 2005; 95(3): 497-505.
14. Cavarretta IT, Neuwirt H, Untergasser G, Moser PL, Zaki MH, Steiner H, et al. The antiapoptotic effect of IL-6 autocrine loop in a cellular model of advanced prostate cancer is mediated by Mcl-1. *Oncogene*. 2007; 26(20): 2822-32.
15. Lee SO, Lou W, Johnson CS, Trump DL, Gao AC. Interleukin-6 protects LNCaP cells from apoptosis induced by androgen deprivation through the Stat3 pathway. *Prostate*. 2004; 60(3): 178-86.
16. Chun JY, Nadiminty N, Dutt S, Lou W, Yang JC, Kung HJ, et al. Interleukin-6 regulates androgen synthesis in prostate cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2009; 15(15): 4815-22.
17. Liu S, Vinall RL, Tepper C, Shi XB, Xue LR, Ma AH, et al. Inappropriate activation of androgen receptor by relaxin via beta-catenin pathway. *Oncogene*. 2008; 27(4): 499-505.
18. Shida Y, Igawa T, Hakariya T, Sakai H, Kanetake H. p38MAPK activation is involved in androgen-independent proliferation of human prostate cancer cells by regulating IL-6 secretion. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 353(3): 744-9.

19. Sarker D, Reid AH, Yap TA, de Bono JS. Targeting the PI3K/AKT pathway for the treatment of prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2009; 15(15): 4799-805.
20. Yang L, Wang L, Lin HK, Kan PY, Xie S, Tsai MY, et al. Interleukin-6 differentially regulates androgen receptor transactivation via PI3K-Akt, STAT3, and MAPK, three distinct signal pathways in prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 305(3): 462-9.
21. Wallner L, Dai J, Escara-Wilke J, Zhang J, Yao Z, Lu Y, et al. Inhibition of interleukin-6 with CNTO328, an anti-interleukin-6 monoclonal antibody, inhibits conversion of androgen-dependent prostate cancer to an androgen-independent phenotype in orchiectomized mice. *Cancer Res*. 2006; 66(6): 3087-95.
22. Mehdi SJ, Ahmad A, Irshad M, Manzoor N, Rizvi MMA. Cytotoxic effect of Carvacrol on human cervical cancer cells. *Biol Med*. 2011; 3(2): 307-12.
23. Arunasree KM. Anti-proliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB 231. *Phytomedicine*. 2010; 17(8-9): 581-8.
24. Slamenova D, Horvathova E, Sramkova M, Marsalkova L. DNA-protective effects of two components of essential plant oils carvacrol and thymol on mammalian cells cultured in vitro. *Neoplasma*. 2007; 54(2): 108-12.
25. Aristatile B, Al-Assaf AH, Pugalendi KV. Carvacrol suppresses the expression of inflammatory marker genes in D-galactosamine-hepatotoxic rats. *Asian Pac J Trop Med*. 2013; 6(3): 205-11.
26. Yin QH, Yan FX, Zu XY, Wu YH, Wu XP, Liao MC, et al. Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of carvacrol on human hepatocellular carcinoma cell line HepG-2. *Cytotechnology*. 2012; 64(1): 43-51.
27. Inamuco J, Veenendaal AK, Burt SA, Post JA, Tjeerdma-van Bokhoven JL, Haagsman HP, et al. Sub-lethal levels of carvacrol reduce *Salmonella Typhimurium* motility and invasion of porcine epithelial cells. *Vet Microbiol*. 2012; 157(1-2): 200-7.
28. Patel B, Shah VR, Bavadekar SA. Anti-proliferative effects of carvacrol on human prostate cancer cell line, LNCaP. *Faseb J*. 2012; 26: 1037.5.
29. Kotake-Nara E, Kushiro M, Zhang H, Sugawara T, Miyashita K, Nagao A. Carotenoids affect proliferation of human prostate cancer cells. *J Nutr*. 2001; 131(12): 3303-6.
30. Kumi-Diaka J, Sanderson NA, Hall A. The mediating role of caspase-3 protease in the intracellular mechanism of genistein-induced apoptosis in human prostatic carcinoma cell lines, DU145 and LNCaP. *Biol Cell*. 2000; 92(8-9): 595-604.
31. Shukla S, MacLennan GT, Marengo SR, Resnick MI, Gupta S. Constitutive activation of PI3 K-Akt and NF-kappaB during prostate cancer progression in autochthonous transgenic mouse model. *Prostate*. 2005; 64(3): 224-39.
32. Zhang X, Guo A, Yu J, Possemato A, Chen Y, Zheng W, et al. Identification of STAT3 as a substrate of receptor protein tyrosine phosphatase T. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104(10): 4060-4.
33. Shen KH, Hung SH, Yin LT, Huang CS, Chao CH, Liu CL, et al. Acacetin, a flavonoid, inhibits the invasion and migration of human prostate cancer DU145 cells via inactivation of the p38 MAPK signaling pathway. *Mol Cell Biochem*. 2010; 333(1-2): 279-91.
34. Lochter A1, Srebrow A, Sympton CJ, Terracio N, Werb Z, Bissell MJ. Misregulation of stromelysin-1 expression in mouse mammary tumor cells accompanies acquisition of stromelysin-1-dependent invasive properties. *J Biol Chem*. 1997; 272(8): 5007-15.
35. Koparal AT, Zeytinoglu M. Effects of Carvacrol on a Human Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Cell Line, A549. *Cytotechnology*. 2003; 43(1-3): 149-54.
36. Liu Y, Song M, Che TM, Bravo D, Pettigrew JE. Anti-inflammatory effects of several plant extracts on porcine alveolar macrophages in vitro. *J Anim Sci*. 2012; 90(8): 2774-83.
37. Celik F, Gocmez C, Bozkurt M, Kaplan I, Kamasak K, Akil E, et al. Neuroprotective effects of carvacrol and pomegranate against methotrexate-induced toxicity in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2013; 17(22): 2988-93.

38. Ghosh PM, Malik S, Bedolla R, Kreisberg JI. Akt in prostate cancer: possible role in androgen-independence. *Curr Drug Metab.* 2003; 4(6): 487-96.
39. Wegiel B, Bjartell A, Culig Z, Persson JL. Interleukin-6 activates PI3K/Akt pathway and regulates cyclin A1 to promote prostate cancer cell survival. *Int J Cancer.* 2008; 122(7): 1521-9.
40. Chen T, Wang LH, Farrar WL. Interleukin 6 activates androgen receptor-mediated gene expression through a signal transducer and activator of transcription 3-dependent pathway in LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2000; 60(8): 2132-5.
41. Ni Z, Lou W, Leman ES, Gao AC. Inhibition of constitutively activated Stat3 signaling pathway suppresses growth of prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2000; 60(5): 1225-8.
42. Chen L, He HY, Li HM, Zheng J, Heng WJ, You JF, et al. ERK1/2 and p38 pathways are required for P2Y receptor-mediated prostate cancer invasion. *Cancer Lett.* 2004; 215(2): 239-47.

The effect of carvacrol on the interleukin-6 gene expression and cell signaling proteins in prostatic cancer cell line DU-145

Keloushadi M¹, Heidarian E^{2*}, Ghatreh-Samani K³, Rafieian-Kopaei M⁴

¹Student Research Committee, Clinical Biochemistry Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran; ²Clinical Biochemistry Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran; ³Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran; ⁴Medical Plants Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran.

Received: 10/Feb/2014 Accepted: 16/Aug/2014

Background and aims: Interleukin-6 (IL-6) causes anti-apoptotic and drug-resistant effects in prostate cancer cells. Carvacrol, an herbal antioxidant, exists in many different plants. The aim of this study was to evaluate the effects of Carvacrol on IL-6 gene expression, cellular signaling proteins, and cell emigration in DU-145 prostate cancer cells.

Methods: In this experimental study, DU-145 cells were treated with various concentrations of carvacrol for 48 hours. Then, cell viability was assessed by MTT assay and the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) was determined. IL-6 levels at various concentrations of carvacrol were determined by ELISA kit. IL-6 gene expression and cell signaling proteins (pStat3 pErk and pAkt) were determined using real-time RT-PCR and western blot analysis, respectively. DU-145 cells migration and invasion were assessed by invasion assay test.

Results: Carvacrol IC₅₀ for DU-145 prostate cancer cells was 406.2 µM. Carvacrol at 150 µM exhibits IL-6 expression at both mRNA and protein levels, but carvacrol reduces IL-6 expression at more than 150 µM at both mRNA and protein levels in a dose-dependent manner (P<0.05). Carvacrol suppresses pStat3, pErk, and pAkt cell signaling proteins at a dose-dependent manner more than 150 µM. Also, carvacrol significantly declines cell viability and emigrational invasion ability in DU-145 prostate cancer cells (P<0.05).

Conclusions: Carvacrol reduces cell growth, proliferation, and cell emigration through diminished cell signaling proteins and IL-6 gene expression, and it causes induction of apoptosis in DU-145 prostate cancer cells. Therefore, carvacrol can be considered as a useful therapeutic agent to treat prostate cancer.

Keywords: Interleukin-6, Prostate cancer, Carvacrol, Signaling proteins.

Cite this article as: Keloushadi M, Heidarian E, Ghatreh-Samani K, Rafieian-Kopaei M. The effect of carvacrol on the interleukin-6 gene expression and cell signaling proteins in prostatic cancer cell line DU-145. J Shahrekord Univ Med Sci. 2015; 17(2): 105-118.

***Corresponding author:**

Clinical Biochemistry Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Rahmatiye, Shahrekord, I.R. Iran; Tel: 00989133145229; E-mail: heidarian46@yahoo.com